Die Interaktion von Bleomycin und Röntgenstrahlen am Adenokarzinom 284 der C3H-Maus

Rudolf Hartl

Diss
München

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Vorstand: N. N.

Die Interaktion von Bleomycin und Röntgenstrahlen am Adenokarzinom 284 der C3H-Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Hartl
aus
Aichach
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. R. Trott

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riethmüller

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Das interessante Thema wurde von Herrn Prof. Dr. K. R. Trott gestellt. Für seine freundliche Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Arbeit fühle ich mich zu großem Dank verpflichtet.

An dieser Stelle möchte ich auch Frau Schury für ihre intensive Betreuung und stetige Hilfsbereitschaft sowie Frau Kleinebrahm für die Pflege der Tiere danken. Allen Angestellten des Instituts möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Dank gilt auch der GSF, sowie der Fa. Mack, Illertissen, für die kostenlose Bereitstellung von Bleomycin.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544319_0006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Versuchstiere und deren Haltung	3
2.2.	Tumor	3
2.3.	Transplantation des Adenokarzinoms 284	4
2.4.	Auswahl der geeigneten Versuchstiere	5
2.5.	Bleomycin	5
2.6.	Bestrahlungstechnik	6
2.7.	Versuchsaufbau und Auswertung	7
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Die Auswirkung von 50 mg BLM/kg KG bzw. einer 12 Gy Einzeitbestrahlung auf das Tumorwachstum	9
3.2.	Abhängigkeit der Interaktion von BLM und Bestrahlung vom zeitlichen Intervall	12
3.2.1.	BLM-Applikation vor Bestrahlung	12
3.2.2.	BLM-Applikation nach Bestrahlung	14
3.3.	Therapieeffekt von BLM und steigenden Strahlendosen	16
3.3.1.	Letalität	16
3.3.2.	Wachstumskurven bei Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen 2 h nach BLM-Gabe	18
3.3.3.	Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorrezidive	20

4.	Diskussion	23
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	23
4.1.1.	Zeitabhängigkeit und Sequenz	23
4.1.2.	Dosiswirkungsbeziehung nach Kombinationsbehandlung	29
4.2.	Andere experimentelle Arbeiten	32
4.2.1.	In-vivo-Experimente	32
4.2.2.	In-vitro-Experimente	35
4.2.3.	Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den zitierten Experimenten	39
4.2.3.1.	Zeit- und Sequenzabhängigkeit der Interaktion von BLM und Röntgenstrahlen	39
4.2.3.2.	Wirkung von BLM auf euoxische und hypoxische Zellen	41
4.3.	Schlußfolgerung aus allen Experimenten	42
5.	Zusammenfassung	45
6.	Literaturverzeichnis	46

1. Einleitung

Das 1966 von Umezawa entdeckte zytostatisch wirksame Antibiotikum Bleomycin hat neben den anderen Antibiotika Adreamycin, Actinomycin D und Mitomycin C einen festen Platz in der Therapie maligner Erkrankungen. Ichikawa (9) beschrieb als erster, kurz nach Umezawas Entdeckung, die antitumoröse Wirkung von Bleomycin bei der Behandlung des Peniskarzinoms. Bleomycin wurde nun bald bei der Therapie anderer Plattenepithelkarzinome eingesetzt, da man eine spezifische Wirkung von Bleomycin gegen Plattenepithelkarzinome annahm.

Die größten klinischen Erfolge mit Bleomycin wurden im Rahmen der Polychemotherapie der Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin), der Non-Hodgkin-Lymphome, der Hodenkarzinome und Teratome erzielt (5, 11, 16, 32). Besonders beim Morbus Hodgkin, sowie bei den Non-Hodgkin-Lymphomen, konnten durch die Einführung von Bleomycin bessere Behandlungsergebnisse als mit herkömmlichen Therapieschemata erzielt werden.

In der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie maligner Erkrankungen wird Bleomycin mit gutem Erfolg bei Plattenepithelkarzinomen des HNO-Bereiches eingesetzt. Daneben kann zusätzlich mit Methotrexat bzw. Cyclophosphamid therapiert werden (20, 31). Die Anwendung von Bleomycin hat sich jedoch in der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie nicht im großen Rahmen durchgesetzt, da bis dato keine einheitlichen Erkenntnisse darüber vorliegen, zu welchem Zeitpunkt Bleomycin in Bezug auf die Bestrahlung zu verabreichen ist, um einen optimalen Effekt zu erzielen.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, eine eventuelle Wirkung von Bleomycin auf die Strahlenempfindlichkeit des Adenokarzinoms 284 aufzuzeigen. Außerdem soll versucht werden, bei der kombinierten Therapie mit Röntgenstrahlen ein optimales Intervall der Bleomycingabe zu ermitteln.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und deren Haltung

Für die Experimente am Adenokarzinom 284 wurden weibliche Inzuchtmäuse des C3H-Stammes, die von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 25°C in Käfigen zu max. 5 Tieren gehalten. Als Nahrung erhielten die Tiere das Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Transplantation zwischen 8 und 10 Wochen alt und wogen ca. 25 g.

2.2. Tumor

Das Adenokarzinom ist spontan entstanden und wurde innerhalb des C3H-Stammes fortlaufend transplantiert. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 9 fortlaufende Tierpassagen verwendet.

Die Proliferationsparameter für das Adenokarzinom 284 wurden 1975 von Szczepanski und Trott (25) ermittelt:

Verdoppelungszeit des Tumorvolumens bei einer Größe von etwa 100 mg	3,0	d
Mittlere Dauer der G-1-Phase	4,7	h
Mittlere Dauer der S-Phase	6,8	h
Mittlere Dauer der G-2-Phase	1,9	h
Mittlere Zykluszeit	13,6	h
Wachstumsfraktion	25	%
Markierungsindex	12,5	%
Zellverlustfaktor	0,5	

Histologisch handelt es sich beim Adenokarzinom 284 um einen alveolär organisierten Tumor mit geringem Stromaanteil. Der Tumor proliferiert nur an einem schmalen Rand nahe der Bindegewebsstraßen, welche die individuellen Läppchen voneinander trennen. Größere Läppchen, vor allem im Inneren des Tumors zeigen häufig Nekrosen. Das Adenokarzinom ist von weicher Konsistenz und besitzt eine grauweiße, an Hirnmark erinnernde, markige Schnittfläche.

2.3. Transplantation des Adenokarzinoms 284

Das Transplantationsmaterial wurde aus unbehandelten Spendermäusen entnommen, deren Tumor einen Durchmesser von ca. 15 mm hatte. Die Tiere wurden mittels Äther abgetötet und der Tumor vorsichtig herauspräpariert. Der Tumor wurde möglichst exakt vom Bindegewebe befreit und mit einer Rasierklinge in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten. Die Tumorstückchen wurden mehrere Male in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um Zellreste und lose Zellen zu beseitigen. Die Empfängermäuse wurden an der rechten Thoraxseite sowie am Rücken rasiert. Um die Transplantation für die Mäuse schmerzfrei durchzuführen, wurden sie mit Hexobarbital (Evipan^{R}) anästhesiert. Auf dem Rücken der betäubten Tiere wurde nach vorheriger Hautdesinfektion, mit einer Schere ein kleiner Schnitt gesetzt. Durch diesen Hautschnitt wurde mit einem Trokar ein vorbereitetes Tumorstückchen subkutan in die rechte Scapularegion implantiert. Nach abermaliger Alkoholdesinfektion wurden die Mäuse in den Käfig zurückgelegt. Die

Wunden heilten binnen einer Woche folgenlos ab. Abschließend wurden die einzelnen Tiere am Ohr durch Lochstanzungen numeriert.

2.4. Auswahl der geeigneten Versuchstiere

Ab dem 6. Tag nach der Transplantation wurde täglich die Tumorgröße mittels einer Plexiglaslochschablone, deren Bohrungen jeweils definierten Tumorgewichten zugeordnet sind, bestimmt.

Für die Experimente wurden ausschließlich Mäuse verwendet, deren Tumorgewicht zwischen 82 und 152 mg lag und deren Tumor sphärisch wuchs. Weiterhin sollte der Tumor frei unter der Haut verschiebbar sein, die Thoraxwand also nicht infiltrieren. Mäuse, deren Tumor bereits am 6. oder 7. Tag nach Transplantation ein Gewicht von mehr als 152 mg erreichte, wurden als Spendermäuse für nachfolgende Transplantationen verwendet. Ebenfalls ausgesondert wurden Tumoren, welche nach 14 Tagen ein Gewicht von 82 mg noch nicht erreicht hatten.

2.5. Bleomycin

Bleomycin, ein komplexes Glykopeptid, wurde 1966 von Umezawa entdeckt. Es ist ein zytostatisch wirksames Antibiotikum, das aus Streptomyces verticillus gewonnen wird. Die zytostatische Wirksamkeit von BLM wird durch folgende

Gegebenheiten erklärt:

a) BLM verursacht eine Hemmung der DNA-Synthese, sowie zu einem geringeren Grad auch der RNA- und Proteinsynthese (22, 23, 28).

b) Es verbindet sich mit der DNA und verursacht Strangbrüche (15, 22, 27).

c) Außerdem stört es den Zellzyklus, indem es eine Blockade in der G-2-Phase des Zellzyklus setzt (1, 8, 13).

Für die Experimente wurden von der Fa. Mack, Illertissen, zur Verfügung gestellte handelsübliche Ampullen mit einer biologischen Aktivität von 15 mg BLM verwendet. Die Trockensubstanz wurde unter sterilen Kautelen in 5 ml aqua bidest. gelöst und den Mäusen intraperitoneal injiziert. Es wurde stets die gleiche Dosis von 50 mg/kg KG verabreicht.

2.6 Bestrahlungstechnik

Die Bestrahlungen wurden mit einem Röntgenstrahlengerät der Fa. C. H. F. Müller, Typ MG 300, bei 300 KV Röhrenspannung und mit 15 mA Röhrenstrom durchgeführt. Als Filterung dienten 0,5 mm Cu und 1,0 mm Al. Das Bestrahlungsfeld war durch einen Bestrahlungstubus mit zweimaliger Ausblendung auf 20 mm Durchmesser festgelegt. Die Einfalldosis wurde bei jeder Bestrahlung mittels einer 17 cm von der Anode entfernt liegenden Victoreen-Ionisationskammer mit nachgeschaltetem Radocon-Dosimeter gemessen. Sobald die gewählte Dosis erreicht wurde, ertönte ein Signal, worauf

die Bestrahlung gestoppt wurde. Für die Bestrahlung wurden die Mäuse mit Hexobarbital narkotisiert und mit Klebestreifen auf einem vertikal verstellbaren Tischchen in Bestrahlungsposition fixiert. Sie wurden so positioniert, daß sich der Tumor exakt im Zentrum des Bestrahlungsfeldes befand und die Tumormitte auf gleichem Niveau mit der Tubusunterkante lag. Der Fokushautabstand betrug dabei 20 cm, die Dosisleistung lag bei 4,3 Gy/min.

2.7. Versuchsaufbau und Auswertung

Durchgeführt wurden folgende Versuche, wobei jede Versuchsgruppe 10 Tiere umfaßte:

1. Gruppe:	12 Gy Einzeitbestrahlung
2. Gruppe:	BLM (50 mg/kg) ohne Bestrahlung
3. bis 6. Gruppe:	BLM 30 min., 2 h, 6 h bzw. 24 h vor Bestrahlung mit 12 Gy appliziert
7. bis 9. Gruppe:	BLM 2 h, 6 h bzw. 24 h nach Bestrahlung mit 12 Gy appliziert
10. bis 16. Gruppe	BLM und 2 h später Einzeldosen von 6, 9, 15, 18, 24, 30 bzw. 36 Gy.

Alle Experimente wurden unter ambienten Bedingungen, d. h. natürlichen Umgebungsverhältnissen, durchgeführt. BLM wurde stets in der gleichen Dosis von 50 mg/kg verabreicht. Die unbehandelten, tumortragenden Versuchstiere wurden zufällig auf die einzelnen Versuchsgruppen verteilt. Vor Abschluß der Messungen verendete Tiere wurden wieder

ersetzt, um in der Endauswertung vollständige Gruppen mit 10 Tieren zu haben.

Der Wachstumsverlauf des Tumors wurde für jede einzelne Maus in ein Diagramm eingezeichnet, in dem das Tumorgewicht (mg) im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit nach der Behandlung (d) aufgetragen wurde. Das mittlere Tumorgewicht zum Zeitpunkt der Behandlung lag bei 100 mg. Aus den Diagrammen wurden die Wachstumszeiten bestimmt, die jeder Tumor benötigte, um das 0,25-, 0,5-, 1,0-, 1,5-, 2-, 3-, 4- bzw. 6-fache des Gewichts bei Behandlungsbeginn zu erreichen.

Zur Erstellung einer Wachstumskurve, welche das durchschnittliche Wachstumsverhalten des Tumors einer Gruppe wiedergibt, wurde der geometrische Mittelwert der Latenzzeiten aus den Einzelmessungen gebildet. Zur Angabe der Fehlerbalken wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes errechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Auswirkung von 50 mg BLM/kg KG bzw. einer 12 Gy Einzeitbestrahlung auf das Tumorwachstum

Die einmalige Gabe einer Dosis von 50 mg BLM/kg KG intraperitoneal hat, wie aus der nicht korrigierten Kurvenschar (Abb. 1) ersichtlich, keine signifikante Auswirkung auf das Wachstum des Adenokarzinoms 284. Der Tumor zeigt nach der Behandlung weder eine Gewichtsreduktion, noch ein Sistieren des Wachstums. Die Zeiten bis zum Erreichen eines Tumorgewichtes von 200, 300 bzw. 400 mg sind bei der mit BLM behandelten Gruppe nur unwesentlich, d. h. um max. 1 Tag länger als bei der Kontrollgruppe (siehe Abb. 2: Gemittelte Wachstumskurven). Lediglich im Größenbereich über 400 mg kommt die BLM-Wirkung mehr zur Geltung: Innerhalb von 5,5 Tagen bzw. 9,5 Tagen erreichte der Tumor ein Gewicht von 400 bzw. 600 mg. Der unbehandelte Kontrolltumor benötigte zum Vergleich 4,5 bzw. 6,5 Tage.

Massive Auswirkung auf das Tumorwachstum bewirkt jedoch eine Einzeitbestrahlung mit 12 Gy (siehe Abb. 2). Infolge der Bestrahlung nimmt der Tumor an Gewicht ab und erreicht erst nach 7,5 Tagen sein Ausgangsgewicht wieder. Nach 24 Tagen werden 400 mg und nach 28,5 Tagen 600 mg erreicht. Besonders im Wachstumsbereich von 200 bis 400 mg zeigt der Tumor eine starke Wachstumsverlangsamung. Die Verdoppelungszeit des Tumors von 200 auf 400 mg beträgt etwa 13 Tage. Der Kontrolltumor benötigte hierfür 2,6 Tage, der mit BLM behandelte Tumor 3 Tage.

Die Dosis von 50 mg BLM/kg bzw. von 12 Gy wurde von allen Tieren gut toleriert und verursachte keine erkennbaren Nebenwirkungen. Die max. tolerierbare Dosis für BLM liegt bei etwa 100 mg/kg (24).

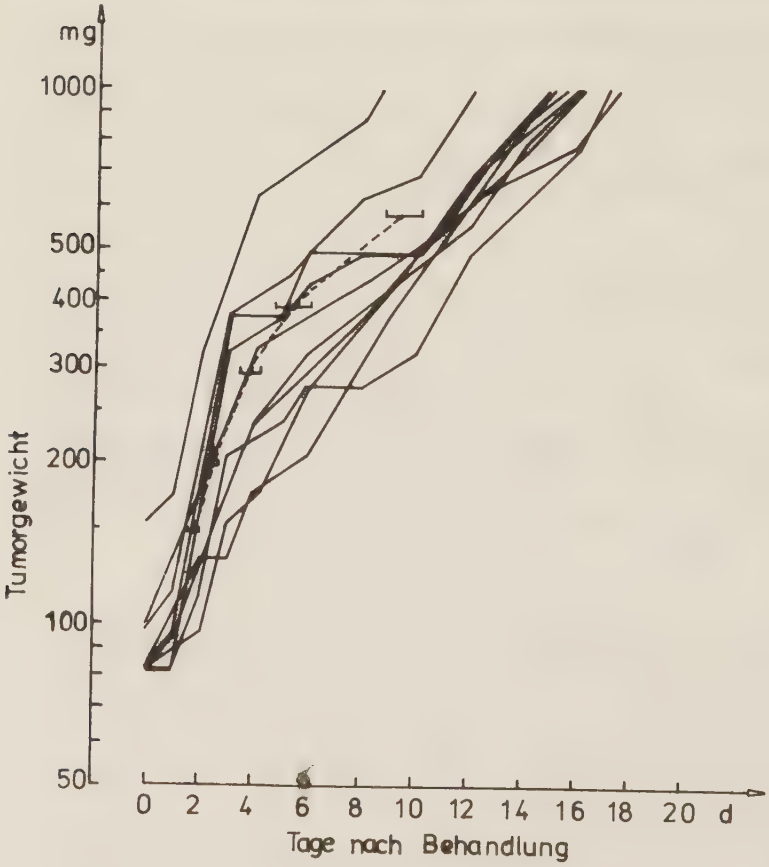

Abb. 1: Unkorrigierte Kurvenschar von mit 50 mg BLM/kg behandeltem Adenokarzinom

------- Gemittelte Wachstumskurve

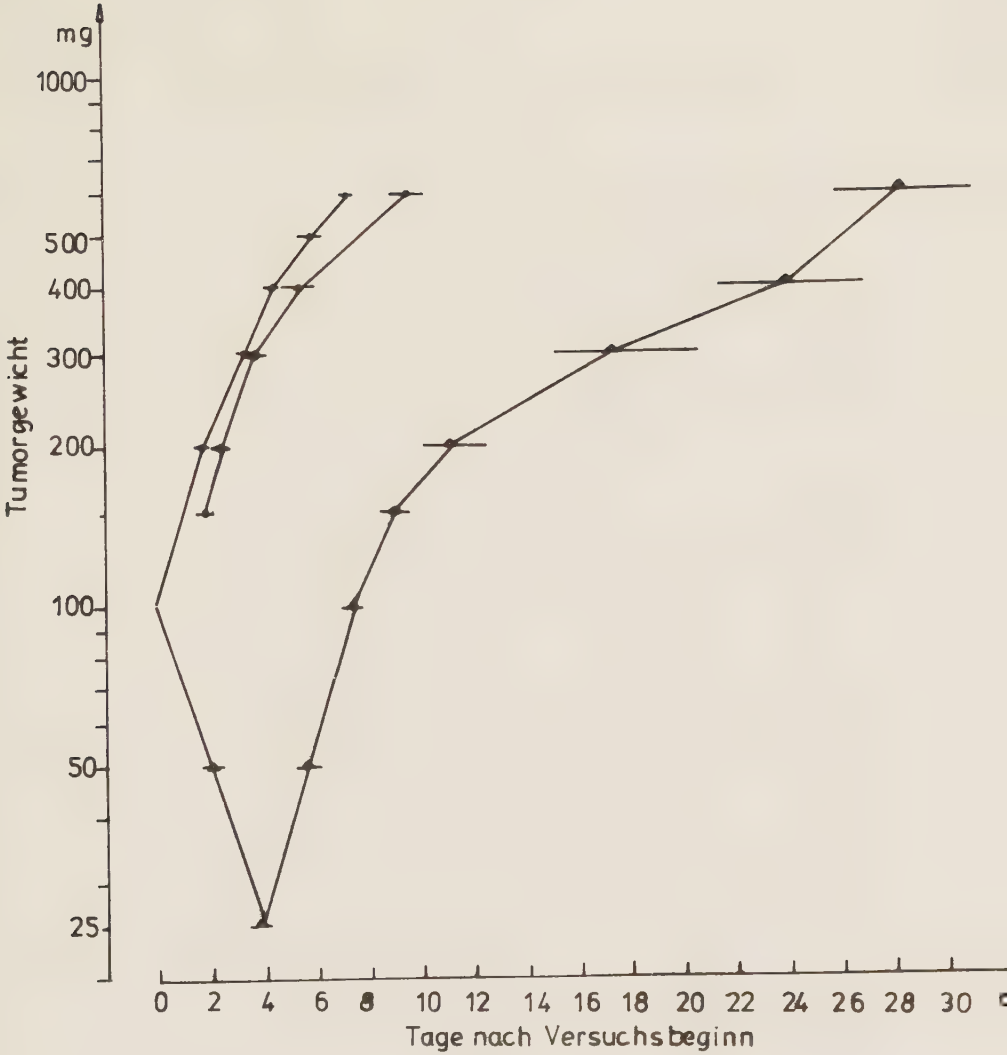

Abb. 2: Gemittelte Wachstumskurven

● = Kontrolle
□ = 50 mg BLM/kg KG
Δ = 12 Gy Einzeitbestrahlung

3.2. Abhängigkeit der Interaktion von Bleomycin und Bestrahlung vom zeitlichen Intervall

3.2.1. BLM-Applikation vor Bestrahlung

Ziel des Experimentes war es, anhand verschiedener Behandlungsschemata (siehe 2.7.), denjenigen Zeitpunkt der BLM-Gabe in der kombinierten Therapie von BLM und 12 Gy Einzeitbestrahlung herauszufinden, bei dem der größte Therapieeffekt erzielt werden konnte.

Aus den gemittelten Wachstumskurven in Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Wachstumsverzögerung vom Intervall abhängt und in folgender Reihenfolge zunimmt: 30 min., 6 h, 24 h, 2 h. Die Kurven der Tumoren, die mit BLM 2 h bzw. 24 h vor Bestrahlung behandelt worden waren, verlaufen ab 50 mg Tumorgewicht identisch und sind gegenüber den Kurven nach BLM-Behandlung 30 min. bzw. 6 h vor Bestrahlung nach rechts verschoben, d. h. mit einem Intervall von 2 h bzw. 24 h wird ein größerer Therapieeffekt erzielt. Bei einem Intervall von 2 h bzw. 24 h benötigt der Tumor 17,5 bzw. 23,5 d um 200 mg bzw. 400 mg Tumorgewicht zu erreichen. Die entsprechenden Zeiten für die Intervalle von 6 h bzw. 30 min. sind um mindestens 4 Tage kürzer. Ab 400 mg Tumorgewicht nähern sich die Kurven einander, wodurch die Zeitunterschiede bis zum Erreichen von 600 mg Tumorgewicht geringer werden. Alle Kurven besitzen im unteren Wachstumsbereich eine größere Steigung als im mittleren und oberen Wachstumsbereich. Verglichen mit der 12 Gy Einzeitbestrahlung zeigen alle Kurven im unteren Wachstumsbereich eine größere Wachstumsverlangsamung.

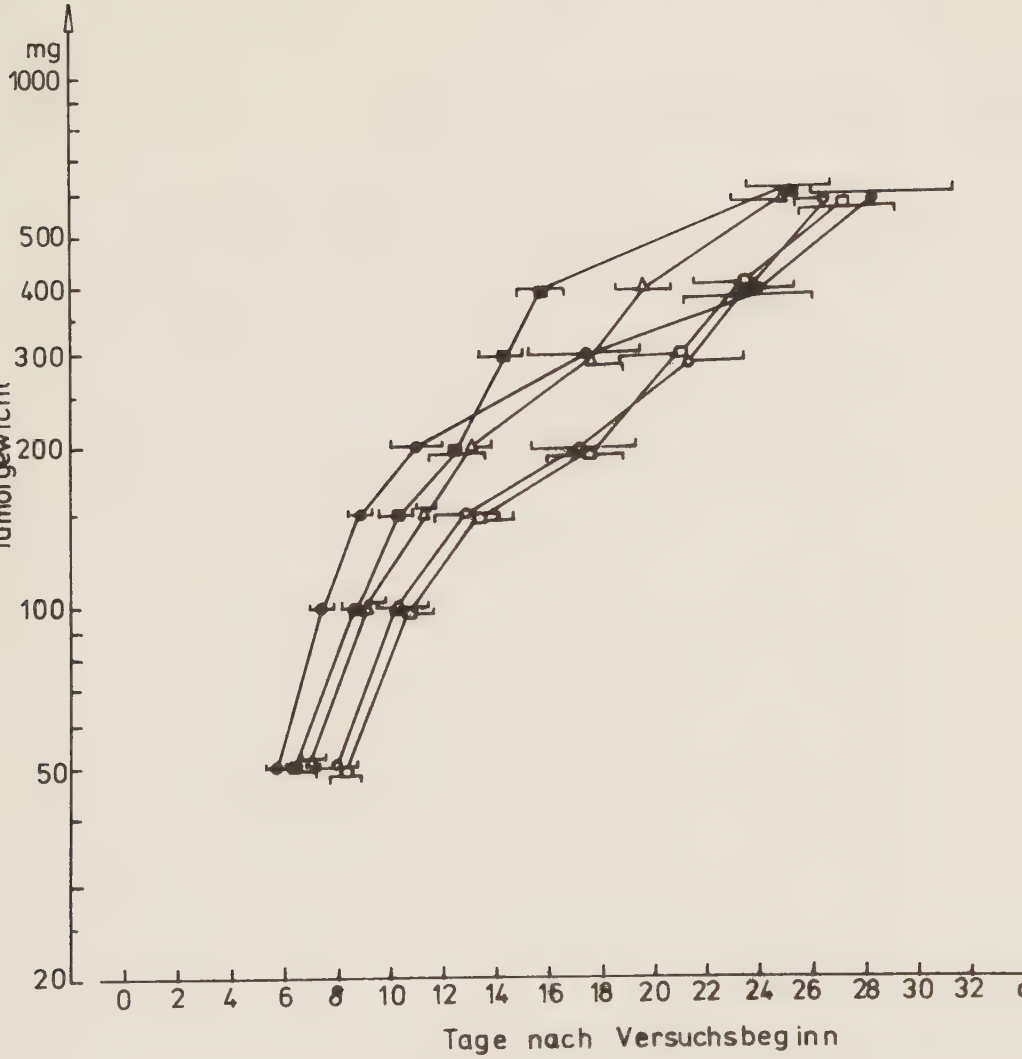

Abb. 3: Gemittelte Wachstumskurven bei BLM-Gabe vor Bestrahlung

● = 12 Gy Bestrahlung

■ = BLM 30 min. vor Bestrahlung mit 12 Gy

□ = BLM 2 h vor Bestrahlung mit 12 Gy

△ = BLM 6 h vor Bestrahlung mit 12 Gy

○ = BLM 24 h vor Bestrahlung mit 12 Gy

3.2.2. BLM-Applikation nach Bestrahlung

Die Kurven der jeweiligen Intervalltherapien (BLM 2 h, 6 h bzw. 24 h nach Bestrahlung injiziert) zeigen untereinander, sowie gegenüber der Kurve nach alleiniger Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 4). Bis zu einem Gewicht von 200 mg verlaufen alle Kurven annähernd gleichförmig und splittern sich dann geringfügig auf.

Die 12 Gy Kurve zeichnet sich im oberen Wachstumsbereich (etwa ab 300 mg) durch eine stärkere Wachstumsverzögerung aus, weshalb die Applikation von BLM nach Bestrahlung unter diesen Bedingungen nicht nur keinen Therapiegewinn ergibt, sondern sogar ein negativer Effekt auf den Behandlungserfolg nicht ausgeschlossen werden kann. Betrachtet man die Zeiten bis zum Ereichen eines Gewichtes von 400 mg, so bestehen markante Zeitunterschiede. Bei 12 Gy Einzeitbestrahlung benötigt das Adenokarzinom 24 Tage, um dieses Gewicht zu erreichen. Gibt man BLM 2 h bzw. 6 h nach Bestrahlung, dann wächst der Tumor innerhalb von ca. 20,5 Tagen auf ein Gewicht von 400 mg heran. Bereits nach 17,25 Tagen sind 400 mg erreicht, wenn BLM 24 h nach Bestrahlung injiziert wird. Verglichen mit dem 12 Gy-Wert besteht hier immerhin eine Differenz von fast 7 Tagen.

Interessant ist weiterhin die Tatsache, daß der ohnehin negative Effekt umso stärker ausgeprägt ist, je größer das zeitliche Intervall zwischen Bestrahlung und BLM-Gabe ist (deutlich erkennbar im obersten Kurvenverlauf der Abb. 4).

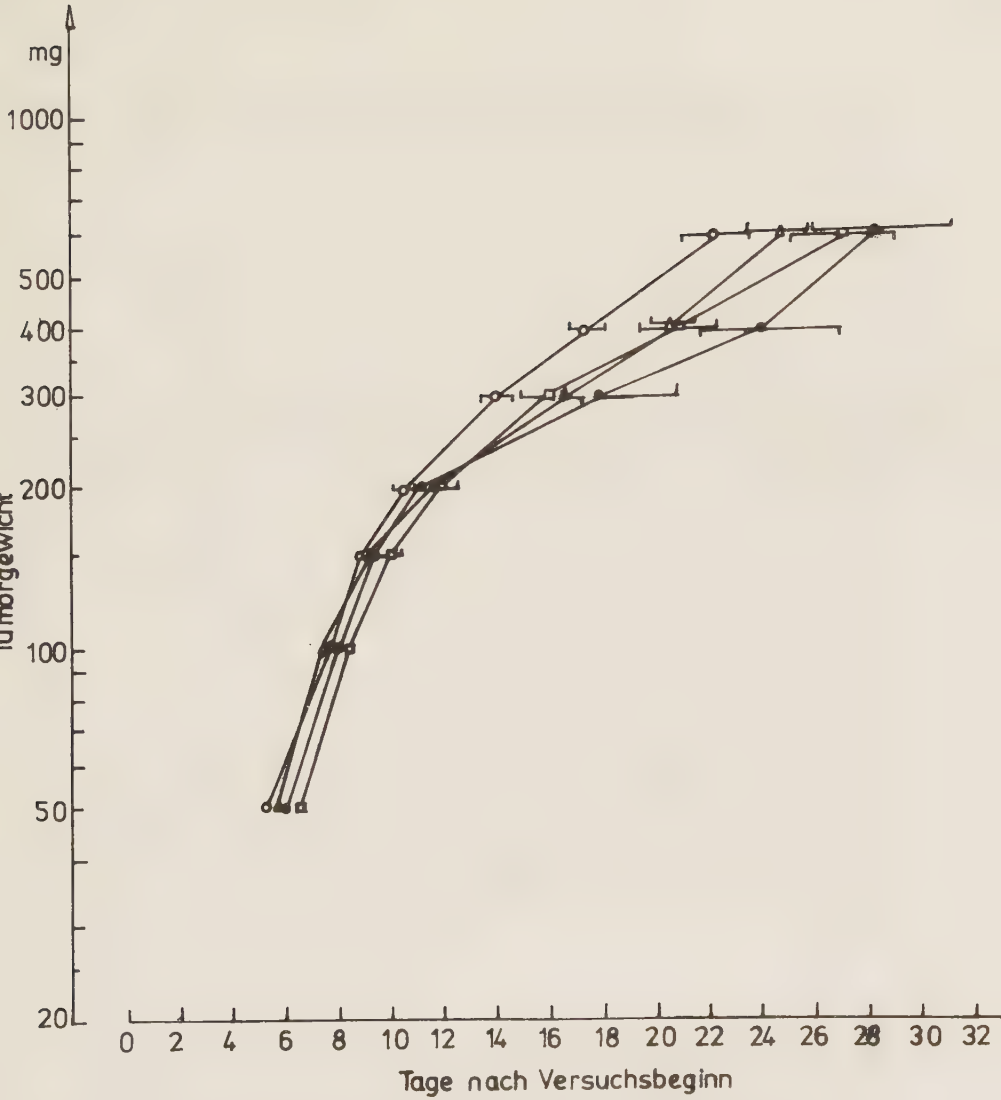

Abb. 4: Gemittelte Wachstumskurven bei BLM-Applikation nach Bestrahlung

● = 12 Gy Einzeitbestrahlung

□ = BLM 2 h nach Bestrahlung mit 12 Gy

Δ = BLM 6 h nach Bestrahlung mit 12 Gy

○ = BLM 24 h nach Bestrahlung mit 12 Gy

3.3. Therapieeffekt von BLM und steigenden Strahlendosen

3.3.1. Letalität

Die Letalität bei den Experimenten mit BLM und steigenden Strahlendosen war sehr hoch. Lediglich die Kombination von BLM und 6 Gy hatte keine Todesfälle zur Folge. Tabelle 1 zeigt, daß die Zahl der verendeten Tiere mit steigender Strahlendosis kontinuierlich zunimmt, wobei lediglich der markante Sprung von 10 toten Tieren bei 30 Gy auf 20 tote Tiere bei 36 Gy auffallend ist. Ein Großteil der Tiere starb innerhalb der ersten 10 Tage nach Behandlung. Die Todesursache konnte nicht eruiert werden. Ein anderer Teil der Tiere, ausschließlich jene, die hohe Strahlendosen bekamen, verendeten nach mehr als 20 Tagen. Manche dieser Tiere hatten plötzlich Symptome eines Ileus und starben binnen weniger Tage. Die Tumoren der abgestorbenen Tiere, welche mit 30 Gy bzw. 36 Gy bestrahlt wurden, zeigten fast alle starke Wachstumsverzögerungen und hatten zum Teil nach mehr als 40 Tagen das Ausgangsgewicht noch nicht wieder erreicht.

Besonders schwierig gestaltete sich das Problem bei der Versuchsgruppe von BLM und 36 Gy. Hier war es unmöglich, eine repräsentative Wachstumskurve zu erstellen, da zu viele Tiere an den Therapienebenwirkungen verendeten. Die Wachstumskurve wäre deshalb nicht repräsentativ, weil sich die Gruppe der Überlebenden und damit in die Auswertung eingehenden Tiere hauptsächlich aus Mäusen, deren Tumor eventuell nicht exakt im Strahlenfeld lag, zusammensetzt und demzufolge die

Wachstumsverzögerung und die Therapienebenwirkungen weniger massiv ausgeprägt waren.

Tage nach ⚡ / Dosis	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	Σ	† %	Ausgangsgewicht (=Tu.-gewicht bei Behandlungsbeginn) nicht wieder erreicht
50 mg BLM/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 Gy BLM u.2h später:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6 Gy	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9 Gy	2	0	0	0	0	0	2	17	2
15 Gy	3	2	0	0	0	0	5	33	3
18 Gy	7	1	0	0	0	0	8	44	8
24 Gy	5	1	0	1	0	0	7	42	7
30 Gy	4	0	2	1	2	1	10	50	6
36 Gy	7	1	0	10	1	1	20	67	13

Tabelle 1: Letalität

3.3.2. Wachstumskurven bei Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen 2 h nach BLM-Gabe

Aufgrund der zuvor durchgeführten Versuche (siehe Abb. 3 und 4) wurde BLM 2 Stunden vor den jeweiligen Strahlendosen verabreicht, um den Effekt von BLM optimal zu nützen. Anhand der Wachstumskurven (Abb. 5) ist leicht zu erkennen, daß die Wirkung der Therapie mit steigender Strahlendosis zunimmt. Ab einer Strahlendosis von 15 Gy nehmen alle Tumoren um mehr als 75 Prozent ihres Ausgangsgewichtes ab. Bei einer Bestrahlung mit 9 Gy in Kombination mit BLM reduziert sich das Gewicht des Tumors auf die Hälfte. Alle Wachstumskurven der Rezidive verlaufen qualitativ ähnlich, mit größeren Steigungen im unteren Kurvenbereich, als im mittleren und oberen Wachstumsbereich. Die 30 Gy-Kurve zeigt ab 150 mg einen steilen Anstieg und nimmt nicht den erwarteten Kurvenverlauf ein. Mit 24 Gy werden dadurch im oberen Wachstumsbereich des Tumors bessere Resultate als mit 30 Gy Bestrahlung erzielt. Die Verzerrung der 30 Gy-Kurve ab 150 mg Tumorgewicht könnte ihre Erklärung in der hohen Zahl der verendeten Tiere haben (siehe 3.3.1. Letalität).

Eine Heilung (d. h. Rezidivfreiheit über einen Zeitraum von 150 Tagen) konnte lediglich in 2 Fällen mit 36 Gy Bestrahlung beobachtet werden. Eine exakte Aussage über Heilungserfolge kann jedoch nicht gemacht werden, da viele Mäuse, bei denen nach mehr als 40 Tagen kein Tumor mehr nachweisbar war, bei denen also eine potentielle Heilungschance bestand, vorzeitig vor Erreichen der 150 Tage verendeten.

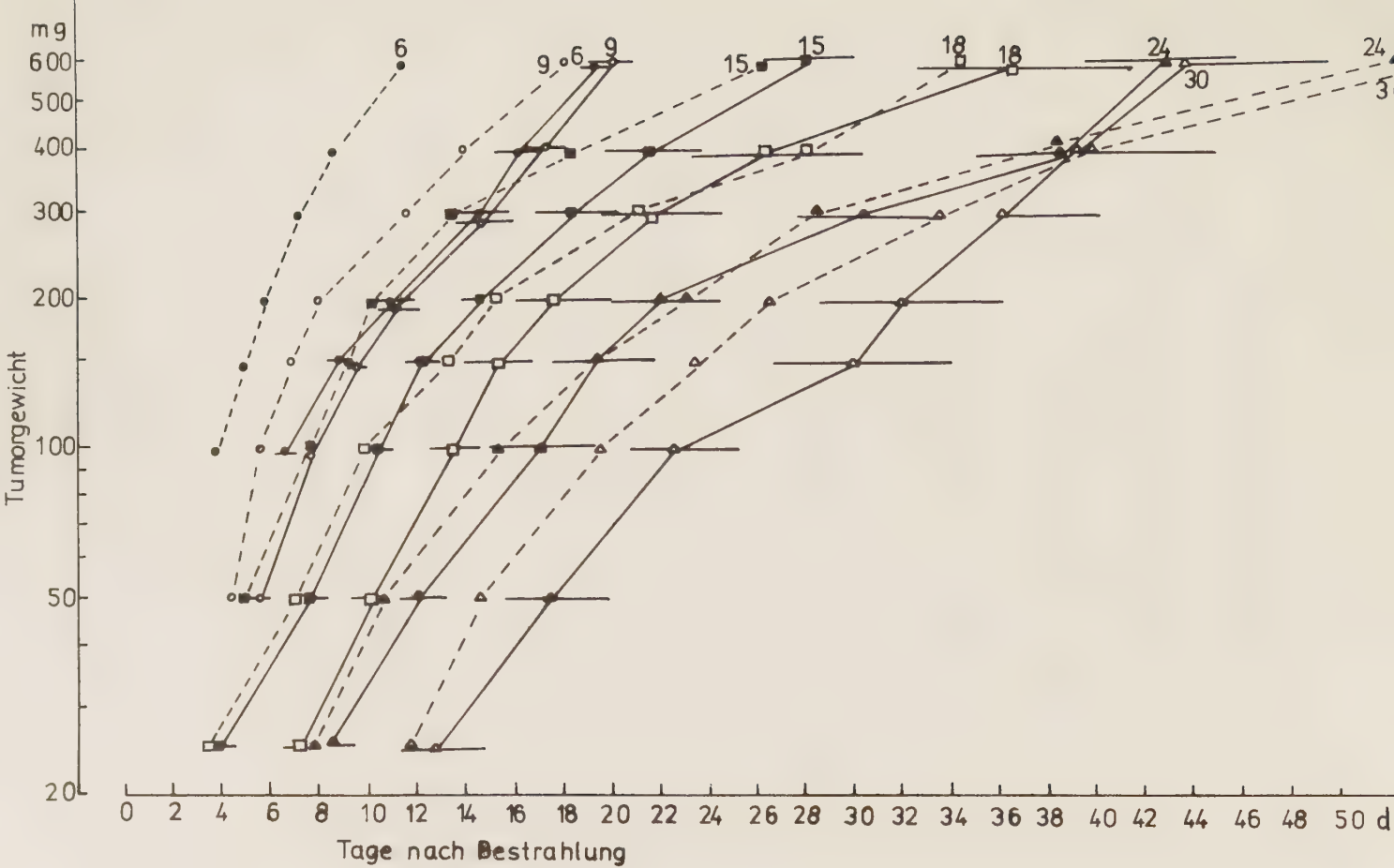

Abb. 5: Gemittelte Wachstumskurven von Tumoren bei Behandlung mit BLM und 2 h später Strahlendosen von 6 bis 30 Gy

--- nur Bestrahlung

—— BLM und Bestrahlung

3.3.3. Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorrezidive

Aus Tab. 2 sind die Werte für die Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumorrezidive ersichtlich. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumszeiten der Rezidive in den jeweiligen Behandlungsgruppen erkennen. In Abb. 6 sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der Tumorrezidive von 200 mg bis 400 mg Tumorgewicht bei Behandlung mit BLM und steigenden Strahlendosen mit den Rezidivwachstumsgeschwindigkeiten bei alleiniger Bestrahlung verglichen. Im unteren Dosisbereich sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der kombiniert behandelten Tumoren im Vergleich mit den nur bestrahlten Tumoren verringert. Ab 15 Gy gleichen sich die Werte beider Behandlungsgruppen an und gehen in einen linearen Verlauf über, d. h. mit steigenden Strahlendosen nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit der Rezidive ab. Die sich nicht dem Kurvenverlauf anpassende, außergewöhnlich langsame Rezidivwachstumsgeschwindigkeit des mit 12 Gy bestrahlten Tumors kann nicht exakt erklärt werden. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, daß sich die Verdoppelungszeiten der Tumorrezidive von 150 mg auf 300 mg bzw. von 300 mg auf 600 mg (siehe Tab. 2) dem Kurvenverlauf wieder anpassen. Die hohe, stark aberrierende Wachstumsgeschwindigkeit der Rezidive von mit BLM vorbehandelten (Intervall 2 h) und mit 30 Gy bestrahlen Tumoren erklärt sich wohl durch die hohe Letalität bei diesem Versuch (siehe 3.3.1).

	150 - 300 mg $\bar{x}$ ± S. E.	200 - 400 mg $\bar{x}$ ± S. E.	300 - 600 mg $\bar{x}$ ± S. E.
Kontrolle	2,37 ± 1,06	2,34 ± 1,10	
12 Gy	6,81 ± 2,77	10,51 ± 2,11	8,20 ± 1,76
BLM	1,93 ± 1,75	2,84 ± 1,89	5,68 ± 1,34
BLM u. 2 h sp. 6 Gy	5,49 ± 1,66	4,62 ± 1,58	4,55 ± 1,35
BLM u. 2 h sp. 9 Gy	5,37 ± 1,56	5,29 ± 1,55	4,77 ± 1,34
BLM u. 2h sp. 15 Gy	5,65 ± 1,82	6,16 ± 2,03	8,76 ± 1,49
BLM u. 2 h sp. 18 Gy	5,76 ± 2,01	6,66 ± 2,38	11,82 ± 2,38
BLM u. 2 h sp. 24 Gy	9,97 ± 1,67	13,44 ± 2,43	11,35 ± 2,12
BLM u. 2 h sp. 30 Gy	5,09 ± 1,71	5,51 ± 1,73	6,10 ± 1,54
BLM 2 h vor ↯	9,48 ± 1,56	5,83 ± 1,36	5,89 ± 1,34
BLM 24 h vor ↯	7,54 ± 1,76	5,64 ± 1,56	4,88 ± 1,39
BLM 6 h vor ↯	5,90 ± 1,59	5,96 ± 1,78	6,97 ± 1,45
BLM 30 min. vor ↯	5,60 ± 1,63	6,77 ± 1,65	8,89 ± 1,64
BLM 2 h nach ↯	5,48 ± 1,73	8,95 ± 1,64	10,29 ± 1,50
BLM 6 h nach ↯	6,82 ± 1,46	8,23 ± 1,40	7,42 ± 1,51
BLM 24 h nach ↯	4,74 ± 1,31	6,73 ± 1,23	7,91 ± 1,39

Tab. 2: Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorrezidive.
Angegeben sind die Verdoppelungszeiten des Tumors von 150 auf 300 mg, von 200 mg auf 400 mg bzw. von 300 mg auf 600 mg Tumorgewicht.

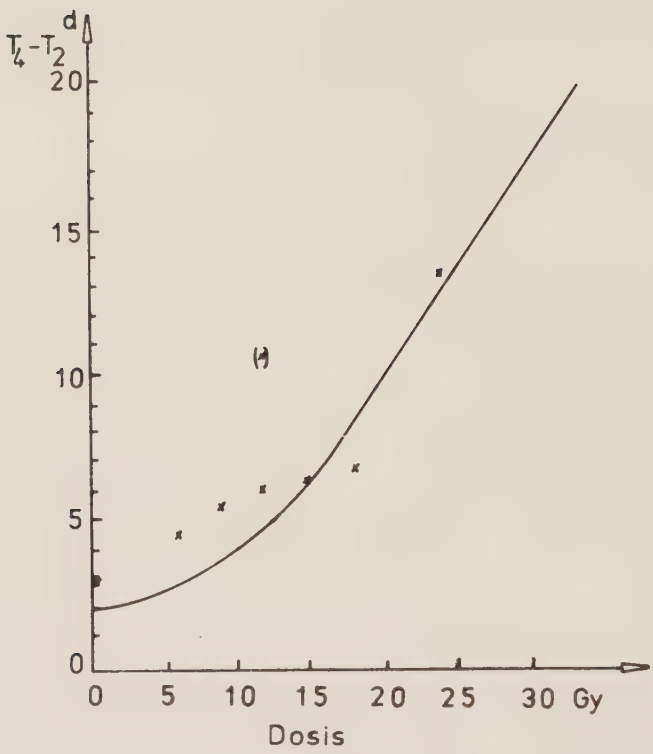

Abb. 6: Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorrezidive. Aufgetragen sind die Verdoppelungszeiten von 200 mg auf 400 mg Tumorgewicht (T_4-T_2) gegen die entsprechenden Strahlendosen.

Durchgezogene Kurve: Nur Bestrahlung (Werte aus Lit. 29)

x x x x: BLM und Bestrahlung

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1.1. Zeitabhängigkeit und Sequenz

Anhand der durchgeführten Experimente konnte eine deutliche Zeit-Abhängigkeit der Wirkung von BLM und Bestrahlung nachgewiesen werden. Gab man BLM vor der Bestrahlung, so wurden bei allen Intervallen bessere Ergebnisse erzielt, als bei BLM-Applikation nach Bestrahlung (siehe Abb. 7). Bei der BLM-Nachbehandlung waren weder signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Intervallen erkennbar, noch war ein Therapiegewinn gegenüber alleiniger Bestrahlung zu verzeichnen (siehe Abb. 4 und 7).

Um den Effekt der BLM-Vorbehandlung quantitativ fassen zu können, wurden mittels der Kurven in Abb. 8 und 9 die jeweiligen Dosisäquivalente bestimmt. In Abb. 8 wurden neben einer Kontrollkurve (unbehandelter Tumor) die gemittelten Wachstumskurven von Tumoren, die mit verschiedenen Strahlendosen behandelt wurden, eingezeichnet. Um die Wachstumsverzögerungszeiten bilden zu können, wurden aus den Kurven in Abb. 8 die Zeiten bis zum Erreichen von 300 mg Tumorgewicht bestimmt. Durch Subtraktion der Zeit der Kontrollgruppe bis zum Erreichen von 300 mg (3,5 d) von den Zeiten der mit unterschiedlichen Strahlendosen behandelten Tumoren erhielt man die jeweiligen Wachstumsverzögerungszeiten, also jene Zeiten, welche die bestrahlten Tumoren zusätzlich benötigen, um 300 mg Tumorgewicht zu erreichen.

Die so ermittelten Wachstumsverzögerungszeiten wurden in Abb. 9 gegen die entsprechenden Strahlendosen aufgetragen. Aus dieser Kurve lassen sich für bestimmte Wachstumsverzögerungen die entsprechenden Strahlendosisäquivalente ermitteln: Bei BLM-Gabe 6 h vor Bestrahlung fand sich eine additive Interaktion, d. h. die Wachstumsverzögerung des Tumors war so groß, wie bei Bestrahlung mit der Summe der effektiven Einzeldosen, wobei 50 mg BLM/kg eine durchschnittliche Wachstumsverzögerung von 0,75 d bewirkt, was einer Strahlendosis von 1,75 Gy entspricht. Durch die BLM-Vorbehandlung des Tumors 6 h vor Bestrahlung wurde eine zusätzliche Wachstumsverzögerung von 1 d erzielt, das einer Strahlendosis von 2 Gy gleichkommt. Der gleiche Therapieeffekt würde demzufolge mit einer alleinigen 13,75 Gy Einzeitbestrahlung erzielt werden.

Die besten Ergebnisse ergaben sich bei BLM-Applikation 2 h bzw. 24 h vor Bestrahlung. Hier betrug die zusätzliche Wachstumsverzögerung ca. 2,75 d (mit gering besseren Werten für das Intervall von 2 h). Diese zusätzliche Wachstumsverzögerung kann einer Dosis von 4 Gy gleichgesetzt werden. Etwas stärker kommt der Effekt beim Kriterium der doppelten Behandlungsgröße zum Tragen, bei der sich ein Strahlenäquivalent von 6 Gy für eine zusätzliche Wachstumsverzögerung von 5,25 d ermittelt. Der Effekt bei diesen beiden Intervallen kann als supraadditiv bezeichnet werden, da man einen Strahlendosisgewinn von 4 Gy zu verzeichnen hat und BLM alleine weniger als 2 Gy ausmacht.

Für die weiteren Experimente (Versuche mit BLM und steigenden Strahlendosen) wurde das Intervall von 2 h gewählt. Bei

BLM-Vorbehandlung des Tumors 2 h vor Bestrahlung ergibt sich sowohl eine stärkere als auch schnellere Schrumpfung, als bei den anderen Intervallen (siehe Abb. 10). Erkennbar ist auch hier an den Schrumpfungskurven, daß eine der Bestrahlung nachfolgende BLM-Applikation keine verstärkende Wirkung zeigt, vielmehr im Vergleich mit den Schrumpfungswerten der 12 Gy Bestrahlung sogar eine Hemmung der Strahlenwirkung vermuten läßt. Erstaunlicherweise zeigt die Therapie mit BLM 24 h vor Bestrahlung einerseits die langsamste Schrumpfung, andererseits neben der Therapie mit BLM 2 h vor Bestrahlung die größte Wachstumsverzögerung. Das ist ein weiterer Beweis dafür, daß die therapieinduzierte Tumorregression unabhängig ist von der therapiebedingten Wachstumsverzögerung und beide Therapieeffekte auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Die Regressionsgeschwindigkeit des Tumors konnte durch die Vorbehandlung mit BLM (Intervall 2 h) um den Faktor 1,5 erhöht werden.

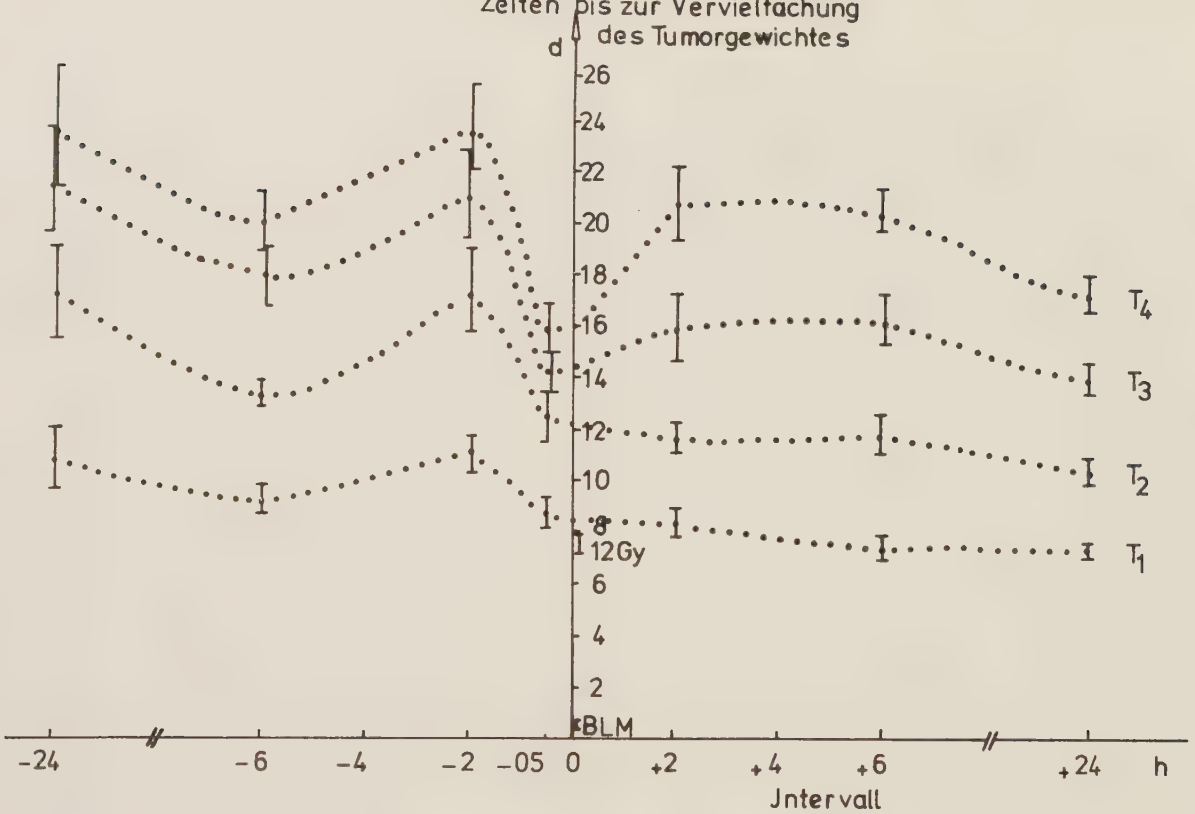

Abb. 7: Abhängigkeit der Interaktion von BLM und Röntgenstrahlen vom Intervall und der Sequenz

T_1 = Zeit bis zum Wiedererreichen des Ausgangsgewichtes

T_2, T_3, T_4 = Zeit bis zum Erreichen des 2-, 3- bzw. 4-fachen Ausgangsgewichtes

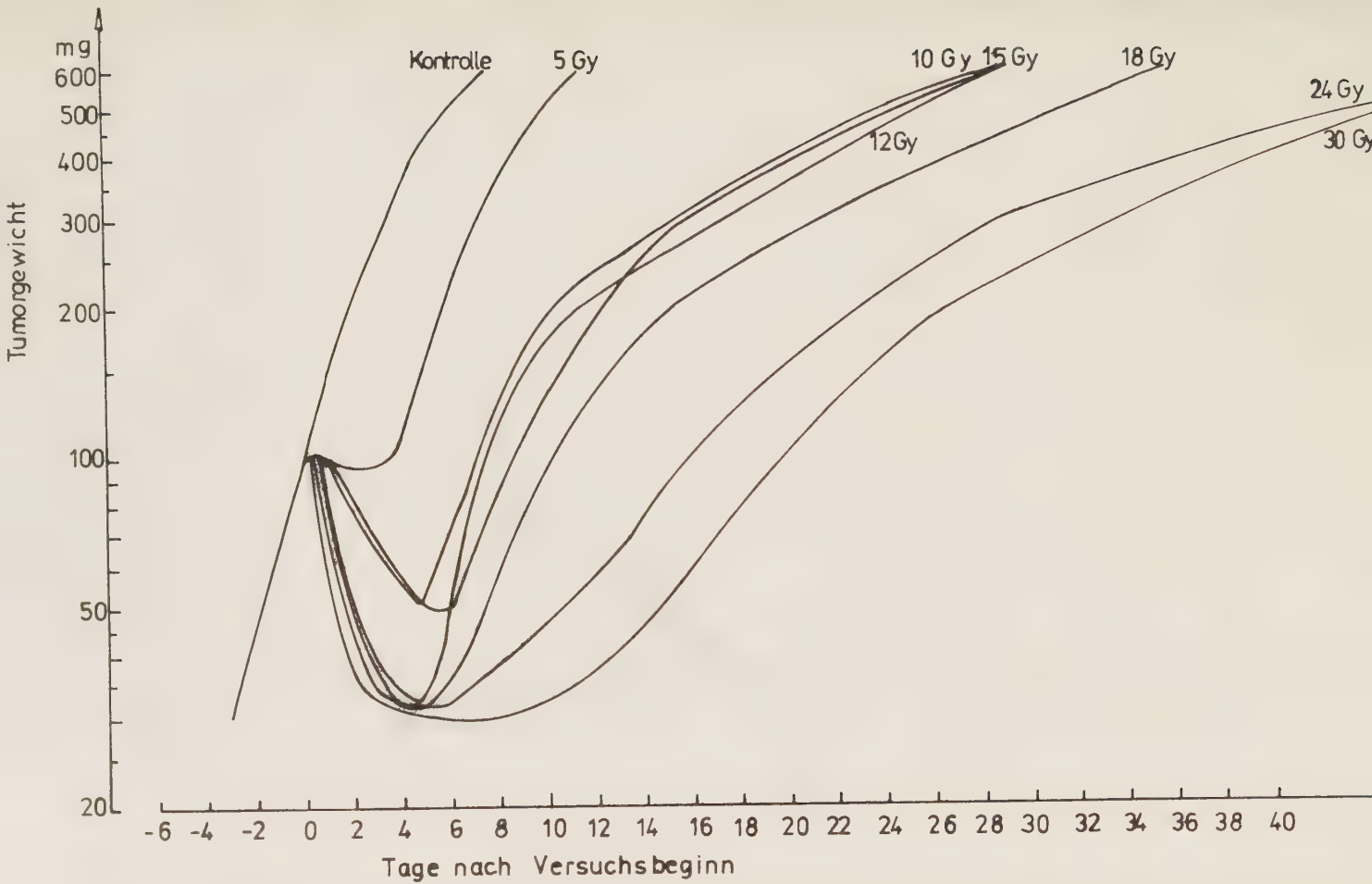

Abb. 8: Behandlung des Adenokarzinoms mit Strahlendosen von 5-30 Gy (Werte aus dem Labor der GSF)

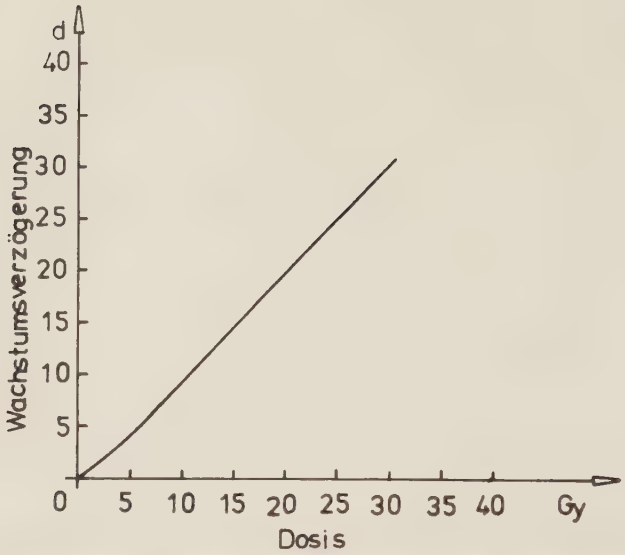

Abb. 9: Abhängigkeit der Wachstumsverzögerung von der Strahlendosis

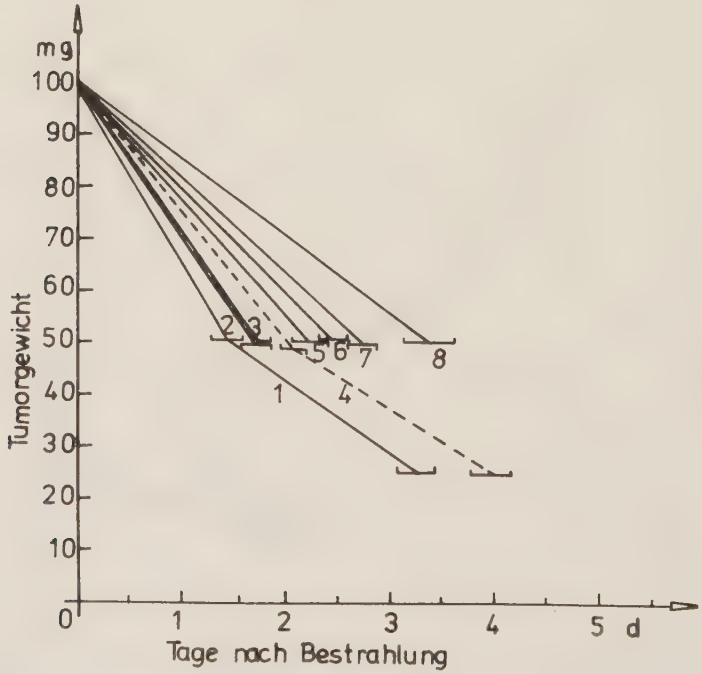

Abb 10: Schrumpfungskurven des Adenokarzinoms
1 = BLM 2 h vor Bestrahlung
2 = BLM 6 h vor Bestrahlung
3 = BLM 30 min. vor Bestrahlung
4 = 12 Gy Bestrahlung
5 = BLM 2 h nach Bestrahlung
6 = BLM 24 h nach Bestrahlung
7 = BLM 6 h nach Bestrahlung
8 = BLM 24 h vor Bestrahlung

4.1.2. Dosiswirkungsbeziehung nach Kombinationsbehandlung

Um die durch BLM und Bestrahlung ausgelöste Verzögerung des Tumorwachstums quantitativ festlegen zu können, wurden Dosiswirkungskurven erstellt, wozu die Zeiten T-1, T-2 und T-4 gegen aufsteigende Strahlendosen aufgetragen wurden, wobei

T-1 die Zeit angibt, die der Tumor ab Behandlungstag benötigt, um sein Ausgangsgewicht vom Behandlungstag wieder zu erreichen und

T-2 die Zeit, die der Tumor zur Verdoppelung seines Ausgangsgewichtes braucht und

T-4 die Zeit zur Vervierfachung des Ausgangsgewichtes. Die Tumoren wurden mit 50 mg BLM/kg vorbehandelt und nach dem aus den Intervallexperimenten ermittelten optimalen Intervall von 2 h mit Strahlendosen von 6 bis 36 Gy bestrahlt. Die Wachstumsverzögerung dieser so behandelten Tumoren wurde mit der nur bestrahlter Tumoren verglichen (Abb. 11). Als Vergleich dienten die Kurven, die die Zeiten bis zum Erreichen des 1-, 2- bzw. 4-fachen Ausgangsgewichtes zum Behandlungszeitpunkt bei alleiniger Bestrahlung wiedergeben. Zwischen den beiden Dosiseffektkurven (T-1 und T-1$'$) besteht im oberen Dosisbereich (etwa ab 15 Gy) eine angedeutete Parallelität mit einer durchschnittlichen Verschiebung von 2,5 d. Durch den Einsatz von BLM kann somit eine Strahlendosis von 4 Gy eingespart werden (siehe Abb. 9). Im unteren Dosisbereich zeigen die Dosiseffektkurven der mit BLM vorbehandelten Tumoren eine im Vergleich zu den Referenzkurven stärkere Steigung, was auf eine größere Effektivität der Vorbehandlung mit BLM in diesem Strahlendosisbereich

hinweist. Die einzelnen Dosiswirkungskurven lassen einen biphasischen Verlauf erkennen, mit einem steilen Anstieg im unteren Dosisbereich (bis 12 Gy) und einem weniger steilen zweiten Teilstück. Begründet wird dieser biphasische Kurvenverlauf durch das Überleben hypoxischer, relativ strahlenresistenter Zellen, welche den flacheren zweiten Kurvenabschnitt determinieren. Der biphasische Kurvenverlauf ist demzufolge Ausdruck einer gemischten Population euoxischer und hypoxischer Zellen (14). Aus dem steileren Anstieg im unteren Dosisbereich kann eine supraadditive Interaktion dieser Subpopulation von Tumorzellen gefolgert werden. In den hypoxischen Zellen, also im höheren Dosisbereich, kann lediglich von einer additiven Interaktion gesprochen werden. Beim Vergleich der Dosiseffektkurven T-2 und T-4 mit den betreffenden Dosiswirkungskurven nur bestrahlter Tumoren zeigt sich, daß der bei T-1 im oberen Dosisbereich vorhandene additive Effekt verloren geht und sich die Kurven beider Behandlungsgruppen weitgehend überlappen. Der bei T-1 beschriebene supraadditive Effekt wird jedoch im unteren Dosisbereich bei allen Kurven beibehalten.

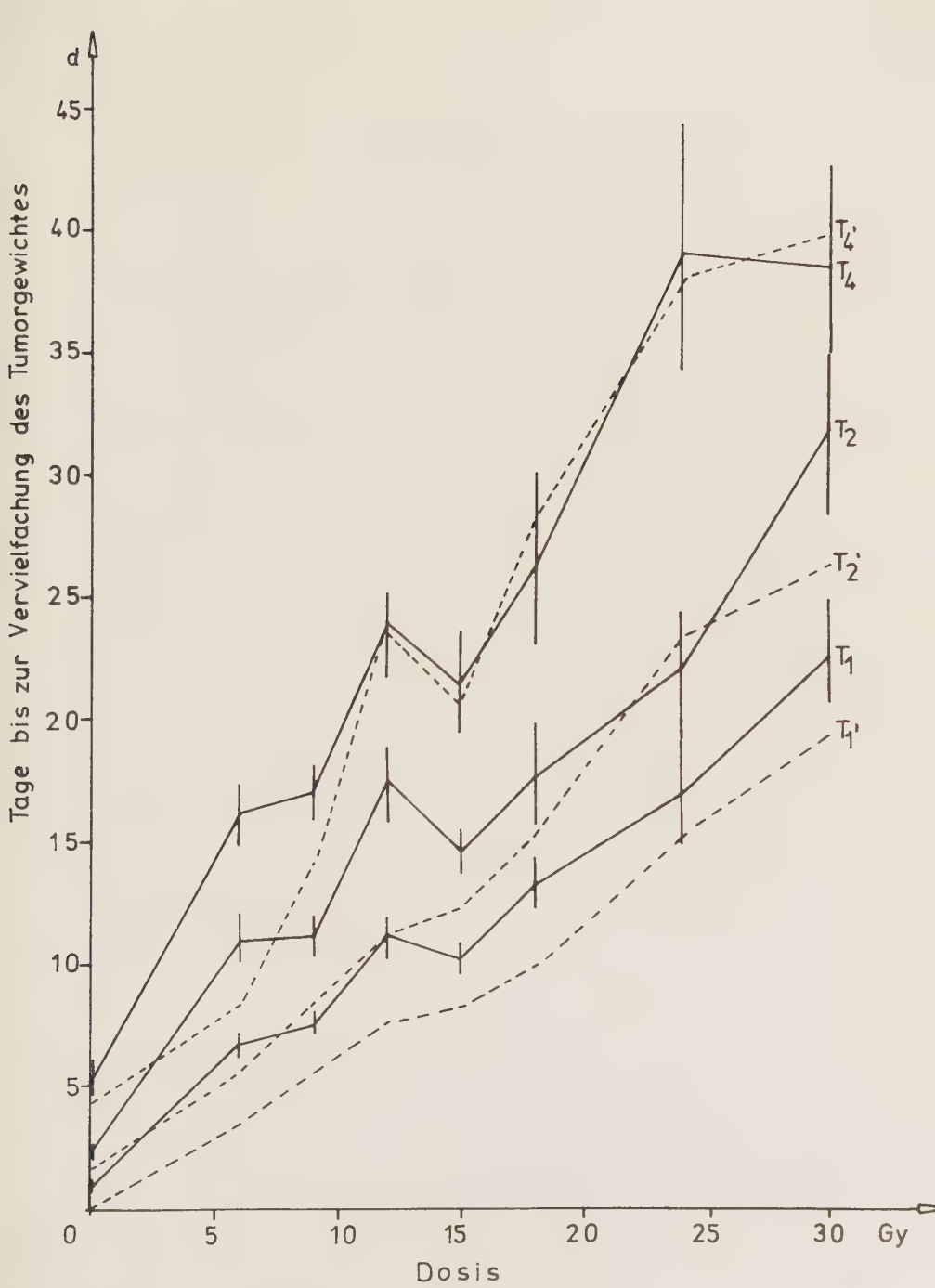

Abb. 11: Dosiseffektkurven

4.2. Andere Experimentelle Arbeiten

4.2.1. In-vivo-Experimente

Die erste experimentelle Arbeit über die Interaktion von BLM und Röntgenstrahlen überhaupt wurde von Jörgensen (10) an einem Hauttumor der Maus durchgeführt. Er verwendete dabei eine bedeutend höhere BLM-Gesamtdosis, die fraktioniert in wöchentlichem Abstand verabreicht wurde. Bestrahlt wurde mit einer Gesamtdosis von 9 Gy, die ebenfalls fraktioniert in Einzeldosen zu 3 Gy entweder simultan zur BLM-Applikation oder intermittierend in der Mitte zwischen den BLM-Applikationszyklen gegeben wurde. Die größten therapeutischen Effekte (supraadditive Interaktionen) wurden bei simultaner BLM-Gabe erzielt. Bei intermittierender BLM-Verabreichung konnte Jörgensen lediglich additive Effekte erzielen.

Twentyman, Kallman und Brown (30) führten umfangreiche Versuche zur kombinierten Strahlen- und Chemotherapie mit drei verschiedenen Mäusetumoren (EMT 6-Tumor von BALB/c-Mäusen, KHT und RIF-1-Sarkome von C3H-Mäusen) durch. Durch eine Monotherapie mit BLM (20 mg/kg) war keine signifikante Wachstumsverzögerung der jeweiligen Tumoren zu verzeichnen. Bei den Experimenten zur Kombinationstherapie mit 12 Gy Bestrahlung und 20 mg BLM/kg zu verschiedenen Intervallen vor oder nach Bestrahlung verabreicht, konnte lediglich beim KHT-Tumor eine ausgeprägte Wachstumsverlangsamung nachgewiesen werden. Bei BLM-Applikation 2 h bzw. 24 h vor Bestrahlung ließ sich ein supraadditiver Effekt nachweisen. Die Wachstumsverzögerung des Tumors bei den übrigen Intervallen war

fast identisch und entsprach dem Wachstumsverhalten des nur mit 12 Gy bestrahlten Tumors. Die Ergebnisse von Twentyman, Kallman und Brown sind in Bezug auf die günstigsten Intervalle der BLM-Gabe mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, wobei jedoch zu beachten ist, daß nur einer von drei Tumoren dieses Verhalten zeigt.

Begg, Kane und Phillips (2) kamen in ihren Versuchen ebenfalls zu Ergebnissen, welche zum Teil mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Bei der Behandlung des EMT 6-Tumors der Maus mit BLM (20 mg/kg) und 8 Gy Bestrahlung erzielten sie bei BLM-Gabe 0 h und 4 h vor Bestrahlung größere Effekte (supraadditive), als bei Bestrahlung und nachfolgender BLM-Applikation. Bei BLM-Gabe nach Bestrahlung (Intervall 1, 4, 8 und 32 h) waren die Wachstumsverzögerungen durchwegs geringer, als bei alleiniger 8 Gy Bestrahlung. Begg et al. nahmen hier einen inhibitorischen Effekt an. Dieses Wachstumsverhalten des Tumors konnte bei den vorliegenden Experimenten am Adenokarzinom ebenfalls festgestellt werden. Im oben beschriebenen Experiment von Twentyman et al. (30) konnte allerdings für den EMT 6-Tumor bei Behandlung mit gleicher BLM-Dosis und 12 Gy Bestrahlung, sowie bei gleicher Intervall-Länge keine signifikante Wachstumsverzögerung festgestellt werden.

Kimler, Vats, Morantz und Henderson (12) untersuchten das Verhalten des intrazerebralen 9 L Rattengliosarkoms auf eine kombinierte Behandlung mit BLM und Bestrahlung. Die größten Wirkungen erzielten sie bei BLM-Gabe (1 mg/kg intrazerebral) 4 h vor einer 20 Gy Einzeitbestrahlung. Die

Überlebenszeit konnte durch diese Behandlungsform um 65 Prozent verlängert werden. Eine Verlängerung der Überlebenszeit um 18 Prozent bzw. 12 Prozent wurde erzielt, wenn BLM bzw. die Strahlendosis alleine verabreicht wurde.

An Dünndarmkryptenzellen versuchten Phillips et al. (17) die Interaktion von BLM und Röntgenstrahlen nachzuweisen und eventuell die zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktion aufzuzeigen. Phillips et al. (17) konnten nachweisen, daß die Wirkung am größten ist, wenn BLM 6 h bzw. 2 h vor der Bestrahlung (9,1 Gy) gegeben wird. Bei Intervallen von 12, 18 und 24 h wurden die Effekte deutlich geringer als bei BLM-Applikation 6 h bzw. 2 h vor Bestrahlung. Die Wirkungen waren aber trotzdem noch größer als bei BLM-Gabe nach Bestrahlung. Als mögliche Erklärung für den ausgeprägten Effekt bei BLM-Gabe 2 h bzw. 6 h vor Bestrahlung führten sie zum einen die Synchronisation der Zellen durch BLM an, zum anderen die teilweise Unterdrückung der Reparaturvorgänge des durch BLM verursachten DNA-Schadens durch die nachfolgende Bestrahlung und vice versa.

4.2.2. In-vitro-Experimente

Für die Deutung der Versuche sind Ergebnisse von in-vitro-Experimenten nützlich. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Versuche unter Bedingungen durchgeführt wurden, die mit denen der vorliegenden Experimente nicht vergleichbar sind. Meist wurden die Zellen längere Zeit (bis zu 24 h) vor oder nach Bestrahlung unterschiedlichen BLM-Konzentrationen ausgesetzt.

Roizin-Towle und Hall (18) untersuchten das Verhalten von euoxischen und hypoxischen Chinesischen Hamsterzellen V 79 auf eine Behandlung mit BLM. Die Zellen wurden 4 h lang bei 37,5 °C unterschiedlichen BLM-Konzentrationen ausgesetzt. Unter hypoxischen Bedingungen wurde eine signifikant höhere Überlebensrate gefunden als unter euoxischen Verhältnissen. Die unterschiedliche Sensibilität auf BLM ist nach Roizin-Towle und Hall zum einen auf einen reduzierten Metabolismus hypoxischer Zellen zurückzuführen, zum anderen auf das Persistieren dieser Zellen in einer, auf BLM-Behandlung weniger sensiblen Zellzyklusphase. Bei ihren Experimenten mit BLM und Bestrahlung an den V 79 Zellen konnten sie eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung vom zeitlichen Intervall der Applikation beider Therapeutika nachweisen. Ein supraadditiver Effekt konnte erzielt werden, wenn die Zellen 3 h nach einer einstündigen BLM-Vorbehandlung (15 µg/ml) mit 5 Gy bestrahlt wurden. Der Effekt war jedoch etwas geringer ausgeprägt, als bei Bestrahlung mit 5 Gy und einer nach 4, 5 oder 6 h folgenden BLM-Behandlung. Additive Effekte konnten sie bei simultaner Applikation beider Modalitäten verzeichnen.

Nach Roizin-Towle und Hall war nicht die Reihenfolge, in der beide Modalitäten (Bestrahlung, BLM) appliziert werden, entscheidend, sondern das zeitliche Intervall dazwischen. Das wurde dadurch erklärt, daß beide Therapeutika ihren größten Effekt auf Zellen in der G-2- und M-Phase des Zellzyklus erzielen. Falls ein genügend großes Zeitintervall zwischen beiden Behandlungen liegt, kommen die resistenten Zellen in eine für die zweite Behandlung sensitive Phase des Zellzyklus.

Die von Roizin-Towle und Hall festgestellte unterschiedliche Zytotoxizität von BLM auf euoxische und hypoxische Zellen konnte von Shrieve und Harris (21) nicht bestätigt werden. Bei ihren Experimenten wurden EMT 6-Zellen 2 h lang unterschiedlichen BLM-Konzentrationen (0-250μg/ml) ausgesetzt. Abweichende Ergebnisse erzielten sie auch bei der kombinierten Therapie mit BLM und Bestrahlung. Die größte Wirkung wurde von ihnen bei einer zweistündigen BLM-Behandlung mit 40μg/ml und einer simultan in der Mitte der BLM-Behandlung verabreichten 5 Gy Bestrahlung erzielt. Die unterschiedlichen Ergebnisse von Roizin-Towle und Hall sowie von Shrieve und Harris, besonders in der Frage der Wirkung von BLM auf euoxische und hypoxische Zellen, könnten durch die verschiedenen Expositionszeiten der Zellen (4 h bzw. 2 h), oder durch die verschiedenen Zellinien oder unterschiedliche Versuchstechniken erklärt werden.

Bleehen et al. (4) testeten die Sensibilität von verschiedenen Bakterienstämmen, von EMT 6-Zellen und HeLa-Zellen auf eine Behandlung mit BLM und Bestrahlung. Bei allen Zellarten

konnten lediglich additive Effekte erzielt werden, wenn BLM vor und/oder während der Bestrahlung präsent war. Eine deutliche Reduzierung der Überlebensrate wurde beim Bakterienstamm Escherichia coli B/r durch eine der Bestrahlung nachfolgende BLM-Behandlung erzielt. Den Effekt führten Bleehen et al. auf eine Hemmung der Reparatur der bestrahlungsinduzierten DNA-Strangbrüche durch die Bakterien zurück. Gestützt wird diese Vermutung durch das Ergebnis des auf gleiche Weise behandelten E. coli B_s-1-Stammes, welcher im Gegensatz zum B/r-Stamm nicht in der Lage ist, DNA-Strangbrüche zu reparieren. Erwartungsgemäß war die strahlensensibilisierende Wirkung von BLM beim B_s-1-Stamm bedeutend geringer ausgeprägt. Keine sinifikante Änderung der Überlebensrate konnte jedoch bei den EMT 6- und HeLa-Zellen durch eine der Bestrahlung nachfolgende 24-stündige BLM-Behandlung mit 0,5 µg/ml bzw. 2,0 µg/ml erzielt werden.

Von Terasima, Takabe und Yasukawa (26) konnte durch in-vitro-Experimente an L-5 und HeLa S-3-Zellen der Maus nachgewiesen werden, daß die potenzierende Wirkung von BLM auf den Bestrahlungseffekt dosisabhängig ist. Die Zellkulturen wurden für diesen Versuch 1 h lang unterschiedlichen BLM-Konzentrationen von 1,25 bis 25 µg/ml ausgesetzt und anschließend mit 5 Gy bestrahlt. Die ermittelten Überlebensraten nahmen mit steigender BLM-Konzentration ab, woraus auf eine Dosisabhängigkeit der Interaktion von BLM und Bestrahlung geschlossen wurde. Außerdem führten sie Versuche mit 4 Gy Einzeitbestrahlung und einer, nach unterschiedlichen Intervallen beginnenden, einstündigen BLM-Nachbehandlung

mit 20 µg/ml durch. Bei simultaner Applikation beider Modalitäten und bei BLM-Behandlung 1 h nach Bestrahlung erzielten sie supraadditive Effekte. Bei Intervallen von 2, 3, 4 oder 5 h traten additive Effekte auf. Bei einem Intervall von 6 h wurde dagegen lediglich ein subadditiver Effekt verbucht.

Die Schlußfolgerung aus diesen Experimenten war, daß der Effekt umso größer ist, je kürzer das Intervall zwischen beiden Modalitäten gewählt wird. Terasima, Takabe und Yasukawa führten den ausgeprägten Effekt bei den kurzen Intervall-Längen bzw. bei simultaner Gabe beider Modalitäten auf eine unmittelbare Verstärkung der Strahlenwirkung und eine Hemmung des nachfolgenden Reparaturmechanismus des Strahlenschadens durch BLM zurück.

Vergleichbare Ergebnisse erzielten Bistrovic et al. (3) mit L-Zellen. Wurden die Zellen 3 h mit 5 µg/ml behandelt und unmittelbar danach oder 0,5, 1 bzw. 2 h nach BLM-Behandlung mit 3 Gy bestrahlt, so ergab nur die unmittelbare Bestrahlung einen supraadditiven Effekt. Mit Zunahme der Intervall-Länge nahm der Effekt ab und entsprach bei einem Intervall von 2 h nur noch einer additiven Interaktion.

4.2.3. Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den zitierten Experimenten

4.2.3.1. Zeit- und Sequenzabhängigkeit der Interaktion von BLM und Röntgenstrahlen

Als Vergleichsarbeiten mit der vorliegenden Arbeit bieten sich in erster Linie die angeführten in-vivo-Experimente von Twentyman et al., Begg et al. und Kimler et al. an. Besonders die Experimente von Twentyman et al. und Begg et al. wurden unter Versuchsbedingungen durchgeführt, welche den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit entsprechen. Zeitlich am günstigsten erwies sich bei den in-vivo-Experimenten eindeutig eine BLM-Gabe vor der Bestrahlung. Interessant ist die Tatsache, daß beim KHT-Tumor im Experiment von Twentyman et al. ebenso wie in der vorliegenden Arbeit beim Adenokarzinom bei zwei Zeitpunkten der BLM-Applikation (2 h und 24 h) vor Bestrahlung supraadditive Effekte erzielt wurden. Begg et al. konnten ebenfalls zwei optimale Intervalle (0 h und 4 h)vor Bestrahlung für die BLM-Gabe beim EMT 6-Tumor ermitteln. Der von Begg et al. gefundene supraadditve Effekt bei BLM-Applikation 0 h und 4 h vor Bestrahlung konnte von Twentyman et al. allerdings bei der Behandlung des gleichen EMT 6-Tumors nicht ermittelt werden.

Nicht einheitlich sind die Ergebnisse der in-vitro-Versuche bei der Ermittlung der günstigsten Zeitpunkte für die BLM-Behandlung. Bei der Mehrzahl der Arbeiten erwies sich jedoch eine simultane Bestrahlung am wirkungsvollsten. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht ohne Vorbehalt auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der angeführten

in-vivo-Experimente übertragbar, da die Versuchsbedingungen zu unterschiedlich sind. Bei simultaner Applikation von BLM und Bestrahlung wurden bei den in-vivo-Experimenten beide Modalitäten zum gleichen Zeitpunkt verabreicht, was für die beschriebenen in-vitro-Versuche meist nicht zutraf. In der Arbeit von Shrieve et al. (21) wurde z. B. bei simultaner Applikation beider Modalitäten die Bestrahlung in der Mitte der zweistündigen BLM-Behandlung verabreicht. BLM war also bereits vor der Bestrahlung anwesend und könnte dadurch eine Strahlensensibilisierung oder Zellschäden bewirkt haben. Bistrovic et al. (3), die ebenfalls bei simultaner Gabe von BLM und Bestrahlung die größten Effekte erzielten, behandelten dabei die Zellen 3 h lang mit BLM und bestrahlten nach Abschluß der BLM-Behandlung.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse sowohl der zitierten Arbeiten als auch der Resultate der vorliegenden Arbeit kann generell festgestellt werden, daß keine signifikanten Effekte zu erwarten sind, wenn BLM nach der Bestrahlung gegeben wird.

Bei allen in-vivo-Versuchen ist die optimale Wirkung, wenn BLM kurz vor der Bestrahlung (0-2 h) gegeben wird, oft traten weitere Optima auf im Rahmen zyklischer Schwankungen der Interaktionen.

4.2.3.2. Wirkung von BLM auf euoxische und hypoxische Zellen

Für die von Roisin-Towle und Hall (18) festgestellte unterschiedliche Wirksamkeit von BLM auf euoxische und hypoxische Zellen gab es bei der vorliegenden Arbeit ebenfalls Hinweise. Die Dosiseffektkurven (Abb. 11) deuten durch ihren biphasischen Verlauf eine Interaktion von BLM und Bestrahlung mit euoxischen, nicht aber mit hypoxischen Zellen an. Denkbar wäre jedoch eine begrenzte zytotoxische, aber keine strahlensensibilisierende Wirksamkeit von BLM auf hypoxische Zellen. Die vertikale Verschiebung der Dosiseffektkurve T-1 (kombiniert behandelter Tumor) im oberen Dosisbereich der Abb. 11 und der dadurch bedingte additive Effekt, könnte hiermit erklärt werden.

4.3. Schlußfolgerung aus allen Experimenten

Die besseren Ergebnisse der BLM-Applikation vor Bestrahlung gegenüber nachfolgender Gabe sind durch die spezifische Wirkung von BLM zu erklären. Da BLM u. a. eine Blockade in der strahlensensiblen G-2-Phase des Zellzyklus setzt, kann dieser Effekt nur genützt werden, wenn BLM zu einem günstigen Zeitpunkt vor der Bestrahlung verabreicht wird.

Nach Elkind (7) ist zwischen Therapeutika, die sich in ihrem Wirkungsmechanismus überlappen, ein zeitliches Intervall zu legen, um optimale Effekte zu erzielen. Bei sich ergänzenden Modalitäten (z. B. Bestrahlung und Hydroxyharnstoff) ergibt eine simultane Verabreichung größte therapeutische Wirksamkeit. Da sich BLM mit Röntgenstrahlen in ihrem Wirkungsmechanismus sowohl überlappen (z. B. Arretierung der Zellen in der G-2-Phase des Zellzyklus, Verursachung von DNA-Strangbrüchen), als auch ergänzen (z. B. Hemmung der Reparaturvorgänge von DNA-Schäden durch BLM) muß demzufolge BLM vor, während und unmittelbar nach Bestrahlung anwesend sein. Diese Bedingungen können wahrscheinlich mit einer BLM-Applikation 2 h vor Bestrahlung annähernd erfüllt werden.

Durch die These von Elkind könnte auch die ausgeprägte Interaktion bei simultaner Gabe von BLM und Bestrahlung in den beschriebenen in-vitro-Experimenten erklärt werden, da bei diesen Versuchen BLM sowohl vor und während, als auch nach der Bestrahlung anwesend war.

Der hohe therapeutische Effekt bei BLM-Gabe 24 h vor Bestrahlung könnte spekulativ dadurch erklärt werden, daß ein Teil der Tumorzellen den nächsten Zellzyklus synchron durchlaufen und zum Bestrahlungszeitpunkt wieder in einer strahlensensiblen Phase vorliegen. Der durch BLM verursachte G-2-Block scheint nur wenige Stunden zu bestehen, denn bei BLM-Gabe 6 h vor Bestrahlung ist bereits ein starker Abfall der therapeutischen Wirksamkeit zu verzeichnen.

Schumann und Göhde (19) beobachteten den gleichen Sachverhalt bei der Behandlung des soliden Ehrlich-Karzinoms der Maus mit BLM. Durch die BLM-Applikation wurde eine Verschiebung der Phasenanteile in Richtung G-2- und M-Phase erreicht. Zwischen 12 h und 24 h nach der Applikation sank der G-2- und M-Anteil wieder auf den Ausgangswert zurück. Ohne eine weitere BLM-Gabe kam es nach weiteren 24 h wieder zu einem Anstieg der G-2- und M-Anteile der Tumorzellen. Die Erklärung dafür vermuteten Schumann und Göhde in einem synchronen Durchwandern des nächsten Zellzyklus.

Es könnte der Versuch unternommen werden, durch eine zweimalige BLM-Gabe, 24 h und 2 h vor Bestrahlung, die Synchronisationsrate zu erhöhen. Entscheidende therapeutische Resultate sind aber durch diese Maßnahme wohl kaum zu erwarten, da nur proliferierende Zellen erfaßt werden können, hypoxische, sich nicht teilende bzw. in der G-0-Phase des Zellzyklus verharrende Zellen können nicht erfaßt

werden, und damit nicht in der strahlensensiblen G-2-Phase arretiert werden. Selbst bei Tiertumoren beträgt die Wachstumsfraktion meist weniger als 50 Prozent (6). Für das Adenokarzinom wurde von Szczepanski und Trott (25) lediglich eine Wachstumsfraktion von 25 Prozent ermittelt.

5. Zusammenfassung

Das auf weibliche C3H-Mäuse transplantierte Adenokarzinom 284 wurde nach Erreichen des Behandlungsgewichtes (82-152 mg) mit Bleomycin (50 mg/kg i. p.) behandelt. Durch die Monotherapie mit Bleomycin wurde lediglich eine Wachstumsverzögerung von 1 Tag erreicht. Bei der Kombination dieser Bleomycindosis mit einer 12 Gy-Einzeitbestrahlung wurde Sequenz und Intervall der Applikation beider Modalitäten variiert um das Schema zu ermitteln, bei dem die größten Effekte erzielt werden können.

Die besten Resultate mit supraadditiver Interaktion wurden bei Bleomycingabe 2 h bzw. 24 h vor Bestrahlung erzielt. Der Effekt wurde auf eine Synchronisation der Tumorzellen durch Bleomycin in der strahlensensiblen G-2-Phase des Zellzyklus zurückgeführt. Die Dosiseffektkurven zeigen im Bereich niederer Strahlendosen einen steileren Anstieg als bei alleiniger Bestrahlung. Im Bereich von Strahlendosen über 15 Gy, in dem die Strahlenwirkung vor allem durch hypoxische Zellen beeinflußt wird, war jedoch keine signifikante Veränderung der Dosiseffektkurve zu verzeichnen.

Lediglich subadditive Effekte wurden bei Bleomycinapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten (2 bis 24 h) nach Bestrahlung verbucht.

Literaturverzeichnis

1. Barranco, S. C., Humphrey, R. M.: The effect of bleomycin on survival and cell progression in Chinese hamster cells in vitro. Cancer Res. 31: 1218-1223 (1971)
2. Begg, A. C., Kane, B. S., Fu, K. K., Philipps, T. L.: The effects of combined bleomycin and irradiation on a solid murine tumor. Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1503-1507 (1979)
3. Bistrovic, M., Maricic, Z., Kolaric, K.: Interaction of bleomycin and radiation in combined treatment on mouse L-cells.
   Int. J. Cancer 18! 540-542 (1976)
4. Bleehen, N. M., Gillies, N. E., Twentyman, P. R.: The effect of bleomycin and radiation on bacteria and mammalian cells in culture. Brit. J. Radiol. 47: 346-351 (1974)
5. Brunner, K.: Zur Kombinationstherapie mit Bleomycin. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.), S. 182-186. Lauptheim: Ahnen (1975)
6. Denekamp, J.: The cellular proliferation kinetics of animal tumors. Cancer Res. 30: 393-400 (1970)
7. Elkind, M. M.: Fundamental questions in the combined use of radiation and chemicals in the treatment of cancer. Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1711-1720 (1979)
8. Hittelman, W. N., Rao, P. H.: Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells. Cancer Res. 34: 3433-3439 (1979)
9. Ichikawa, T.: Die weitere Entwicklung der Bleomycinbehandlung. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.), S. 142-147. Laupheim: Ahnen (1975)

10. Joergensen, S. J.: Time-dose relationships in combined bleomycin treatment and radiotherapy. Europ. J. Cancer 8: 531-534 (1972)

11. Jungi, W. F., Senn, H. J.: Erste Erfahrungen mit Bleomycin in fraktionierten kleinen Dosen, kombiniert mit Vincristin und Dexamethason bei malignen Lymhomen. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.), S. 176-177. Laupheim: Ahnen (1975)

12. Kimler, B. F., Vats, T. S., Morantz, R. A., Henderson, S. D.: Response of the 9 L rat brain tumor to combination treatment with radiation and bleomycin. Int. J. Radiat. Oncol. 7: 1069-1074 (1981)

13. Kimler, B. F.: The effect of bleomycin and irradiation on G-2 progression. Int. J. Radiat. Oncol 5: 1523-1526 (1979)

14. Kummermehr, J., Trott, K. R.: Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit eines transplantablen Fibrosarkoms durch Synchronisation mit Hydroxyharnstoff. In: Kombinierte Strahlen- und Chemotherapie (Hrsg. Wannenmacher), S. 52-56. München-Wien Baltimore: Urban und Schwarzenberg (1979)

15. Nagai, H.: Decrease of melting temperature and single strand scission of DNA by bleomycin in the presence of 2-mercapto-ethanol. J. Anbibiotics 22: 569-573 (1969)

16. Paulisch, R.: Klinische Ergebnisse mit Bleomycin. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.), S. 138-139. Laupheim: Ahnen (1975)

17. Phillips, T. L., Ross, G. Y., Goldstein, L. S., Begg, A. C.: The interaction of radiation and bleomycin in intestinal crypt cells.
Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1509-1512 (1979)

18. Roizin-Towle, L., Hall, E.: The effect of bleomycin on aerated and hypoxic cells in vitro, in combination with irradiation.
Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1491-1494 (1979)

19. Schumann, J., Göhde, W.: Teilsynchonisation von Tumorzellen durch Bleomycin, Impulszytophotometrische Untersuchungen. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.) S. 79-83. Laupheim: Ahnen (1975)

20. Seagren, S. L., Byfield, J. E., Davidson, T. M., Sharp, T.: Bleomycin, cyclophosphamide and radiotherapy in regionally advanced epidermoid carcinoma of the head and neck. Int. J. Radiat. Oncol. 8: 127-132 (1982)

21. Shrieve, D. C., Harries, J. W.: Effects of bleomycin and irradiation on euoxic and hypoxic cells. Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1495-1498 (1979)

22. Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H.: On the mechanism of action of bleomycin: Scission of DNA strands in vitro and in vivo. J. Antibiotics 22: 446-448 (1969)

23. Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., Umezawa, H.: Mechanism of action of bleomycin. Studies with growing cultures of bacterial and tumour cells. J. Antibiotics 21: 379-386 (1968)

24. Szczepanski, L. v., Trott, K. R.: The combined effect of bleomycin and hyperthermia on the adenocarcinoma 284 of the C3H mouse. Eur. J. Cancer 17: 997-1000 (1981)

25. Szczepanski, L. v., Trott, K. R.: Post-irradiation proliferation kinetics of a serially transplanted murine adenocarcinoma. Brit. J. Radiol. 48: 200-208 (1975)

26. Terasima, T., Takabe, Y., Yasukawa, M.: Combined effect of x-ray and bleomycin on cultured mammalian cells. Gann 66: 701-703 (1975)

27. Terasima, T., Umezawa, H.: Lethal effect of bleomycin on cultured mammalian cells. J. Antibiotics 23: 300 (1970)

28. Terasima, T., Yasukawa, M., Umezawa, H.: Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treated with bleomycin. Gann 61: 513-516 (1970)

29. Trott, K. R., Kummermehr, J.: Split dose recovery of a tumor and its stroma. Brit. J. Radiol. 55: 841-846 (1982)

30. Twentyman, P. R., Kallmann, R. F., Brown, J. M.: The effect of time between x-irradiation and chemotherapy on the growth of three solid mouse tumors. Int. J. Radiat. Oncol. 5: 1499-1501 (1979)

31. Wannenmacher, M., Esser, E., Schumann, J.: Erste klinische Ergebnisse der Strahlenbehandlung nach Teilsynchronisation mit Bleomycin, Strahlentherapie 149: 131-140 (1975)

32. Wilms, K.,Wilmanns, W.: Klinische Erfahrungen mit Bleomycin bei der Behandlung von soliden Tumoren und Lymphogranulomatosen. In: Bleomycin. Experimentelle Grundlagen und erste klinische Ergebnisse (Hrsg. Wilmanns, W.), S. 134-137. Laupheim: Ahnen (1975)

Lebenslauf

Am 18. 10. 1953 wurde ich, Rudolf Hartl, in Aichach als drittes Kind meiner Eltern, Michael und Kreszenz Hartl, geboren. In meinem Heimatort Klingen besuchte ich von 1960-1968 die Volksschule. Von 1968-1971 erlernte ich im elterlichen Betrieb das Metzgerhandwerk. Bis 1974 war ich in der Metzgerei und Landwirtschaft meiner Eltern tätig. Von 1971-1974 besuchte ich die Abendrealschule Augsburg. Durch den Besuch des Bayernkollegs Augsburg von 1974-1977 erhielt ich nach erfolgreichem Abschluß mein Abiturzeugnis. Im Wintersemester 1977/78 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Techn. Universität München. Zum Studium der Humanmedizin wechselte ich im Sommersemester 1978 an die LMU München.